

PCT/JP01/00641

31.01.01

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 26 MAR 2001

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 1月25日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-016746

出 願 人

Applicant(s):

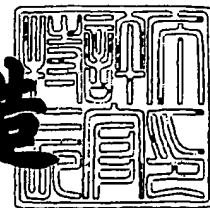
農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2001年 3月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3015212

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP01-1002

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市松代5-16, 522棟101号

 【氏名】 中島 信彦

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市松代5-1-3, ナルシマハイツB-1
 05号

 【氏名】 金森 保志

【特許出願人】

 【識別番号】 391030284

 【氏名又は名称】 農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所長 井上 元

【代理人】

 【識別番号】 100088904

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 庄司 隆

【選任した代理人】

 【識別番号】 100107939

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 大島 由美子

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な翻訳活性促進高次構造

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の群より選ばれる塩基配列によって構成される翻訳活性促進機能を保持する RNA の高次構造；

①配列表の配列番号 1 ～ 7 に記載の配列で示される塩基配列、

②前記①の塩基配列を含有する塩基配列、

③前記①の塩基配列と少なくとも約 5 0 % の配列上の相同性を有しかつ翻訳活性促進機能を保持する塩基配列、

④前記①～③の塩基配列の相補鎖、

⑤前記①～④の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする塩基配列、

および

⑥前記①～⑤の塩基配列において 1 ないし数個の塩基の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有し、かつ翻訳活性促進機能を保持する塩基配列。

【請求項 2】 請求項 1 の高次構造において、少なくとも PK（シュードノット）I、II、III の構造を保持する RNA の高次構造。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 の高次構造を保持する塩基配列の何れか一からなるポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 4】 請求項 3 の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 5】 請求項 1 または 2 の高次構造を保持する塩基配列の何れか一からなるポリヌクレオチドを利用する異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法。

【請求項 6】 請求項 3 のベクターまたは請求項 4 の形質転換を利用した異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法。

【請求項 7】 請求項 3 に記載のベクターを用いて無細胞タンパク質合成系で実施することを特徴とする異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法。

【請求項 8】 AUG 翻訳開始コドンを用いない請求項 5 または 6 の異種タ

ンパク質または異種ポリペプチドの合成方法。

【請求項9】 請求項2のRNAの高次構造においてPK（シュードノット）を構成する塩基対の組み合わせを変更し、該変更された高次構造を保持する塩基配列を利用することを特徴とする任意のコドンから任意の異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成を開始する方法。

【請求項10】 請求項2のRNAの高次構造においてPK（シュードノット）Iを構成する塩基対の組み合わせのうち翻訳開始点直前の1組または2組以上の塩基対の組み合わせを変更し、該変更された高次構造を保持する塩基配列を利用することを特徴とする任意のコドンから任意の異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成を開始する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、新規な翻訳活性促進機能を有するRNAの高次構造に関するものである。さらに詳しくは、コオロギ麻痺病様ウイルス類 [Cricket paralysis-like (CrPV-like) viruses] の外被タンパク質コード領域上流に形成されるRNA高次構造（IGR-IRES）またはその相同構造を構成する塩基配列、およびこの配列を利用して異種タンパク質または異種ポリペプチドを合成する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

リボソームを用いてメッセンジャーRNA（mRNA）を翻訳してタンパク質を合成するとき、メチオニンをコードするAUG翻訳開始コドンが必要とされる。これは、開始コドンを決める働きをする翻訳開始メチオニンtRNAという特殊な翻訳開始専用のtRNA分子が翻訳開始のときに必須とされるためである。従って、従来の組み換えDNA技術を利用したタンパク質合成系では、リボソームを介して生産されるタンパク質やペプチドなどはそのアミノ末端が必ずメチオニンになり、任意のアミノ酸からのタンパク質合成開始は不可能であった。最近になって、メチオニン以外のアミノ酸をアミノ末端に有するタンパク質でも合成

可能な報告がある（特表2000-517186号）。

【0003】

一方、昆虫ウイルスのIGR-IRES (Intergenic Region-Internal Ribosome Entry Site) を介した翻訳開始では、IGR-IRES自身が高次構造を形成することによって翻訳開始点を決めており、AUG翻訳開始コドンに依存せずにグルタミン（文献2）やアラニン（文献3、4、5、7）から翻訳が始まる。IGR-IRESの構造については、3'側約40塩基についての報告がこれまでになされていた（文献2）が、IGR-IRES全体の構造については不明であった。以前の報告（文献1、6）では、IRES下流に位置する各ウイルスの外被タンパク質遺伝子のコード領域の部分配列も翻訳開始に関与するという結果が得られていたため、メチオニン、アラニン、グルタミン以外のアミノ酸からの翻訳開始は不可能と考えられていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題のひとつは、新規な翻訳活性促進機能を保持する塩基配列を提供することである。より具体的には、新規な翻訳活性促進機能を保持する塩基配列であって、任意のアミノ酸からのタンパク質またはポリペプチドの合成を可能にする塩基配列を提供することである。また本発明の別の課題は、この塩基配列を利用したタンパク質またはポリペプチドの合成手段を提供することである。

【0005】

【発明の課題の解決手段】

本発明者は、まずすべてのCrPV様ウイルス類で特定の高次構造が形成可能なこと、この高次構造の下流に遺伝子の読み枠を連結すると、様々なアミノ酸からタンパク質の翻訳開始が可能なこと、さらに、翻訳開始点直前の高次構造の形成に関与する塩基対の組み合わせを変更すると任意のコドンからの任意のタンパク質合成を開始できることを見出して本発明を完成した。

【0006】

すなわち、本発明は、

1. 下記の群より選ばれる塩基配列によって構成される翻訳活性促進機能を保持するRNAの高次構造；

①配列表の配列番号1～7に記載の配列で示される塩基配列、

②前記①の塩基配列を含有する塩基配列、

③前記①の塩基配列と少なくとも約50%の配列上の相同性を有しかつ翻訳活性促進機能を保持する塩基配列、

④前記①～③の塩基配列の相補鎖、

⑤前記①～④の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする塩基配列、

および

⑥前記①～⑤の塩基配列において1ないし数個の塩基の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有し、かつ翻訳活性促進機能を保持する塩基配列、

2. 前記1の高次構造において、少なくともPK（シュードノット）I、II、IIIの構造を保持するRNAの高次構造、

3. 前記1または2の高次構造を保持する塩基配列の何れか一からなるポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

4. 前記3の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

5. 前記1または2の高次構造を保持する塩基配列の何れか一からなるポリヌクレオチドを利用する異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法、

6. 前記3のベクターまたは前記4の形質転換を利用した異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法、

7. 前記3に記載のベクターを用いて無細胞タンパク質合成系で実施することとを特徴とする異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法、

8. AUG翻訳開始コドンを用いない前記5または6の異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法、

9. 前記2のRNAの高次構造においてPK（シュードノット）を構成する塩基対の組み合わせを変更し、該変更された高次構造を保持する塩基配列を利用することを特徴とする任意のコドンから任意の異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成を開始する方法、

10. 前記2のRNAの高次構造においてPK（シュードノット）Iを構成する塩基対の組み合わせのうち翻訳開始点直前の1組または2組以上の塩基対の組み合わせを変更し、該変更された高次構造を保持する塩基配列を利用することを特徴とする任意のコドンから任意の異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成を開始する方法、
 に関するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】

（翻訳活性促進機能を保持するRNAの高次構造）

本発明において提供される翻訳活性促進機能を保持するRNAの高次構造は、配列表の配列番号1～7に記載の塩基配列と同一、または実質的に同一な塩基配列を含有する。上記翻訳活性促進機能を保持するRNAの高次構造は、コオロギ麻痺病様ウイルス類 [Cricket paralysis-like (CrPV-like) viruses] の外被タンパク質コード領域上流に形成されるRNA高次構造（IGR-IRES）またはその相同構造を構成する塩基配列で構成される。塩基配列が、配列表の配列番号1～7に記載の塩基配列と全く同一でなくとも、配列表の配列番号1～7に記載の塩基配列で構成されるRNAの高次構造と同様の高次構造が保持されている限りは、翻訳活性促進機能は保持される。また、翻訳活性促進機能を保持するためには、少なくともシュードノット (Pseudoknot, PK) I、II、IIIの構造（塩基対形成に基づく結び目構造）を保持するRNAの高次構造を構成する塩基配列が存在する必要がある。なお、コオロギ麻痺病様ウイルス類とは、PSIV (Plautia stali intestine virus)、HiPV (himetobi P virus)、DCV (Drosophila C virus)、CrPV (Cricket paralysis virus)、TrV (Triatoma virus)、BQCV (black queen-cell virus)、RhPV (Rhopalosiphum padi virus) 等が例示される。上記ウイルス類の塩基配列については、文献8～15にそれぞれ報告がなされている。

【0008】

配列表の配列番号1～7に記載の塩基配列と実質的に同一の塩基配列としては、例えば、配列番号1に記載の塩基配列と約50%以上、好ましくは約70%以

上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。そして、これら配列表の配列番号1に記載の塩基配列と実質的に同一な塩基配列は、少なくともPK（シュードノット）I、II、IIIの構造またはその相同構造を維持していることが必要である。配列表の配列番号2～7に記載の塩基配列についても、同様の例示を挙げることができる。

【0009】

塩基配列の相同性を決定する技術は、自体公知であり、これを広く利用し決定可能である。

【0010】

さらに、このように特定された塩基配列をもとにして、1以上、例えば1～30個、より好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～10個、特に好ましくは1ないし数個、の塩基の欠失・置換・付加あるいは挿入といった変異を有する塩基配列も提供される。欠失・置換・付加あるいは挿入の手段は自体公知であり、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、またはポリメラーゼ連鎖増幅法（PCR）を単独または適宜組み合わせ、例えばサンプブック等編「モレキュラークロニング、ア ラボラトリーマニュアル 第2版」コールドスプリングハーバーラボラトリー、1989、村松正實編「ラボマニュアル遺伝子工学」丸善株式会社、1988、エールリッヒ、H.E. 編「PCRテクノロジー、DNA増幅の原理と応用」ストックトンプレス、1989等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、例えばUllmerの技術（Science、219、666、1983）を利用することができる。変異が導入されたいずれの塩基配列も少なくともPK（シュードノット）I、II、IIIの構造またはその相同構造を維持していることが必要である。

【0011】

本発明の一つの態様において、翻訳活性促進機能を保持するRNAの高次構造を構成する塩基配列は、上記した塩基配列の相補鎖も意味する。そして、その相補鎖が、少なくともPK（シュードノット）I、II、IIIの構造またはその相同構造を維持していることが必要である。

【0012】

本発明の別の態様において、翻訳活性促進機能を保持するRNAの高次構造を構成する塩基配列は、上記した塩基配列の対応する領域にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドでありうる。ハイブリダイゼーションの条件は、例えばサムブルック等編「モレキュラークローニング、ア ラボラ トリーマニュアル 第2版」コールドスプリングハーバーラボラトリー、(1989)等に従うことができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は一般に知られたものであるが、その一例としては、50%ホルムアミド、5×SSC (150 mM NaCl、15 mM クエン酸三ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.6)、5×デンハーツ溶液、10%デキストラン硫酸、および20 μg/mlの変性剪断サケ・精子DNAを含む溶液中、42℃で一晩、次いで、約65℃において0.1×SSC中での洗浄といった条件であってもよい。これらの塩基配列は目的の高次構造を維持する限りは、上記した塩基配列にハイブリダイズするものであれば必ずしも相補的配列でなくともよい。例えば、配列表の配列番号1～7に記載の塩基配列またはその相補的配列に対する相同性が、例えば少なくとも約40%、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上のものであってもよい。

【0013】

上記RNAの高次構造は、同種のタンパク質またはポリペプチドのみならず、異種のタンパク質またはポリペプチド等の製造において、これらの翻訳を促進するため、非常に有用である。ここで、同種とは上記RNAの高次構造の由来である昆虫ウイルスを意味し、異種とは昆虫ウイルス以外の生物種を意味する。該RNAの高次構造を構成する塩基配列は、例えば公知のベクターに挿入し、宿主細胞に導入して、公知のタンパク質発現系において異種タンパク質または異種ポリペプチドなどの合成に利用できる。また、該RNAの高次構造を構成する塩基配列を含有するベクターを用いて、無細胞タンパク質発現系 (Nature、179、160～161、1957) において異種タンパク質または異種ポリペプチドなどを合成することができる。無細胞タンパク質発現系は、公知の、例えば胚

芽、家兎網状赤血球等由来のリボソームを使用したものが利用できる。

【0014】

本発明の態様の一つである異種タンパク質または異種ポリペプチドの合成方法は、上記RNAの高次構造を構成する塩基配列を翻訳を促進する塩基配列として利用することを特徴とする。該合成方法は、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術であっても、または自体公知の無細胞タンパク質合成法であってもよい。本発明の実施例においては、家兎網状赤血球をリボソーム源として使用する無細胞タンパク質合成法を利用してタンパク質合成を確認したが、これに限定されるものではない。

【0015】

ベクターの構築は、自体公知の手段が応用され、例えばレプリコンとして、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して行われる。形質転換のより好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法であるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系の利用である。ベクターは、選択した宿主または発現系の種類により選別され、発現目的とする異種または同種の遺伝子と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子とを構成要素とする。上記RNAの高次構造を構成する塩基配列は、発現目的とする同種または異種の遺伝子の翻訳領域直前に挿入することが好ましい。また、複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子は、原核細胞か真核細胞かによって選別され、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー、マーカー配列、転写配列、非翻訳配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナルや、さらにmRNAを安定化し得る5'および3'非翻訳配列等を自体公知の方法によって組合せて利用できる。

【0016】

また、翻訳されたタンパク質を、小胞体内腔、ペリプラスミックススペースまたは細胞外環境へ分泌させるために、適当な分泌シグナルを発現するタンパク質に組み込むことができる。これらのシグナルはタンパク質に本来的なものであってもよく、あるいは異種性のシグナルであってもよい。

【0017】

ベクターとしては、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、例えばバキュロウイルス、パポバウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス等のウイルス由来のベクター、ならびにそれらを組み合わせたベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメント由来のベクター、例えばコスミドおよびファージミド等が挙げられる。

【0018】

適当な宿主の代表的なものとしては、細菌細胞、例えば連鎖球菌属 (*streptococci*)、ブドウ球菌属 (*staphylococci*)、大腸菌 (*E.coli*)、ストレプトミセス (*Streptomyces*) および枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 細胞；真菌細胞、例えば酵母細胞およびアスペルギルス属 (*Aspergillus*) 細胞；昆虫細胞、例えばドロソフィラ S2 (*Drosophila S2*) およびスポドプテラ Sf9 (*Spodoptera Sf9*) 細胞；動物細胞例えばCHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293およびボウズ (Bows) メラノーマ細胞；ならびに植物細胞等が挙げられる。

【0019】

ベクターを宿主に導入することによる形質転換は、自体公知の方法により行うことができる。さらに、該ベクターが導入された形質転換体を、自体公知の各々の宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養し、培養細胞中で生産された、あるいは培養上清中に分泌されたタンパク質またはポリペプチドなどを自体公知の方法で回収することにより、目的とする異種タンパク質または異種ポリペプチドなどが得られる。

【0020】

このような遺伝子工学的手法による異種タンパク質や異種ポリペプチドなどの合成において、上記RNAの高次構造を利用すると、従来は不可能であった任意のアミノ酸からの合成が可能になる。

【0021】

また、上記RNAの高次構造のうち、PKを構成する塩基対の組み合わせ、特にPKIを構成する塩基対であって翻訳開始点直前の塩基対の組み合わせ、の1組または2組以上を変更すると、任意のコドンから任意のタンパク質合成が開始できる。変更する塩基対の組み合わせが2組以上であるとき、該塩基対の組み合わせは、連続して存在する組み合わせであってもよいし、不連続であってもよい。例えば、PSIVのPKIの翻訳開始点直前の高次構造をcacuuからcacccに改変したところ、改変前のプラスミドでは翻訳されなかった異種タンパク質であるGFPの翻訳がなされた。すなわち、野生型のIGR-IRESでは翻訳できない異種遺伝子からタンパク質を翻訳するには、PKを構成する塩基対の組み合わせ、特にPKIを構成する塩基対であって翻訳開始点直前の塩基対の組み合わせ、を変更すればよい。上記のような塩基対の組み合わせが変更されたRNAの高次構造は、少なくともPK（シュードノット）I、II、IIIの構造またはその相同構造を維持していることが必要である。

【0022】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【実施例1】

CrPV様ウイルス類（文献8）のIGR-IRES領域の塩基配列をコンピュータプログラム CLUSTAL Wで整列させたところ、図1および図2に示したような一次構造上の相同性が得られた。図1および図2中、黒線で囲んだ領域は、保存されている配列を表す。しかし、この方法ではIRESの機能に重要な役割を果たす相補配列に関する保存性は検出できなかった。さらに、CrPV様ウイルス類の一種のPSIVのIGR-IRES領域を二次構造予測プログラム MFOLDで予測した結果を図3に示す。この方法でも、IRESの機能に重要な役割を果たす相補配列に関する保存性は検出できなかった。そこで、CrPV様ウイルス類のIGR-IRES領域の共通性や機能的に重要な構造に関する情報を得るために、変異導入実験を後述する方法で行った。まずステム・ループ構造、シュードノット構造（塩基対形成に基づく結び目構造）における塩基

を変異させ、それによるタンパク合成との関係を確認することにより高次構造を検討した。その結果、図4～図6に示すようにIGR-IRESの機能に重要な部分を抽出して塩基配列を整列させると、すべてのCrPV様ウイルス類で図5および図6に示した高次構造が形成可能であった。各ウイルスで、4本のステム・ループ構造(STIII、STIV、STV、STVI)、3個のシュードノット構造(PKI、PKII、PKIII)の形成が確認された。この高次構造のなかで3個のシュードノット構造を欠失させると、翻訳は起きなかった。また、翻訳開始点よりも下流の塩基配列はIGR-IRESの高次構造には関与していないことが判明した。これは、以前の報告(文献1、6)で下流に異なる遺伝子を導入した場合に翻訳が阻害された原因は、IGR-IRESの高次構造の形成を阻害するような配列が挿入されたためであるということを示唆する。以上の結果から、3個のシュードノット構造を含む高次構造が、タンパク質の翻訳開始および促進に寄与することが判明した。さらに、該高次構造の下流に遺伝子の読み枠を連結すると、様々なアミノ酸からタンパク質の翻訳が開始された(図7)。つまり翻訳第1コドンを変更してもタンパク質の合成開始が可能であり、全20アミノ酸に対応するいずれのコドンが翻訳第1コドンであってもタンパク質が合成された。

【0023】

次に、上記変異導入実験で用いたプラスミドと同じものを使用し、ウイルス外被タンパク質遺伝子の代わりに、ルシフェラーゼ遺伝子とクラゲの緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子をaug翻訳開始コドンを欠落させた上でPKIIIの直下に挿入し、上記実験と同様の方法で発現させた(図8)。野生型のIGR-IRESの下流からルシフェラーゼ遺伝子は翻訳されたがGFP遺伝子は翻訳されなかった。これを改良する目的で、IGR-IRESの配列の一部であるPKIの塩基配列を野生型のcacuu(図8のAの左)からcacc(図8のAの右)に改変したところ、GFP遺伝子を翻訳させることが可能になった。かくして翻訳開始点直前の高次構造の形成に関与する塩基対の組み合わせを変更することで、任意のコドンから任意のタンパク質の合成を開始する方法(第8図)を確立した。なお、図8のB中、1. BMVは、プロモモザイクウイルスRNAを意味する。2. pT7CAT-5375は、発現タンパク質が外被タンパク質で開

始コドンがCAA (Gln) のプラスミドを意味する。3. pIRES-Luc は、PKIが野生型・発現タンパク質がルシフェラーゼ・aug欠落のプラスミドを意味する。4. pIRES-GFPは上記3. の発現タンパク質がGFPの場合であり、5. pIRES'-Lucとは、PKIが変異型・発現タンパク質がルシフェラーゼ・aug欠落のプラスミドを意味する。6. pIRES'-GFPは上記5. の発現タンパク質がGFPの場合であり、7. RNA無添加はコントロールである。また、Lucとはルシフェラーゼ、CATはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、GFPは緑色蛍光タンパク質を意味する。

【0024】

実験は以下に行った。

(変異プラスミドの構築)

ベクターとしてプラスミドpT7CAT-5375を使用した。pT7CAT-5375は、文献1に記載されているように、大腸菌のファージに由来するT7RNAポリメラーゼが認識するプロモータ配列の下流にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子を挿入し、さらにその下流に本発明からなる高次構造を保持する各塩基配列(翻訳促進配列)と適当なタンパク質をコードする遺伝子とを接続したベクターである(特許第3002724号を参照)。ここではタンパク質をコードする遺伝子としてPSIV外被タンパク質遺伝子を使用した。このプラスミドからT7RNAポリメラーゼでRNAを合成し、そのRNAを用いて家兎網状赤血球ライセートでin vitro翻訳を行った。その翻訳産物をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。

【0025】

なお、変異断片の増幅は、変異配列を含む合成DNAプライマーと厳密性の高いDNAポリメラーゼ(KOD Dash:東洋紡株式会社)を用いて行い、増幅された断片は、アガロース電気泳動で精製し、次いでリン酸化し、自己ライゲーションさせ、大腸菌(E.coli)に形質転換した。ヌクレオチドの置換はDNAシーケンシングで確認した。ステムループIIIのらせん部分の削除と置換はフュージョンPCR(Virology214:611-618,1995)で行った。ヌクレオチド(nt)6051-6061を欠失させるために、PSIV配列のnt6029-60

50とnt6062-6080を含むフォワードプライマー (GGTTAAATTTCGAGGTAAAAAATTGCTATA) とpT7Blue (Novagen社) のnt27-5を含むリバースプライマーを初期増幅のため合成した。次に、nt6028-6018を削除するためPSIV配列のnt6043-6029とnt6017-5998を含むリバースプライマー (CCTCGAAATTTAACCAGATCACATAGTCAGCTTTC) とpT7Blue (Novagen社) のnt28-47を含むフォワードプライマーを別の初期増幅のため合成した。これらのプライマーの下線部はフュージョンPCRの15ntオーバーラップを示す。この二つのプライマーセットを使った個々の初期増幅の後、その二つの増幅DNA断片を混合し、Virology214:611-618, 1995の記載に従って融合した。最終増幅は、pT7Blueのnt28-47とnt27-5を担持するプライマーを使って実行し、次いでこの増幅されたDNA断片をゲルで精製し、リン酸化してそしてライゲーションさせた。らせん部分を置換するためには、置換ヌクレオチドを含むより長いプライマーを使用して初期増幅を行った。

【0026】

(変異PSIV-IRESによるin vitro翻訳分析)

プラスミドDNAは、PSIVゲノムの外被タンパク質コード領域のnt7096のところで、大腸菌 (E.coli) 由来の制限酵素、EcoRIで直鎖化した。この直鎖状にしたDNAは、Ribo-MAX large-scale RNA production system (Promega社) を使いT7RNAポリメラーゼで転写した。翻訳産物を標識するためにBiotin in vitro Translation Kit (Roche Molecular Biochemicals社) を使用した。蒸留水中に溶解したRNAを68℃に加熱後、氷で冷やし、次いで家兎網状赤血球ライセートと混合した。RNA終濃度は、compensatory mutation analysisを行うときに4μg/mlとなるよう調整した。欠失分析の場合は、翻訳された外被タンパク質の少量を検出のため、RNA濃度を16μg/mlに増加させた。ビオチン標識されたタンパク質はSDS-ポリアクリルアミド (12%) ゲル電気泳動で分離してPVDF膜上に転写し、そしてECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて検出した。

【0027】

【発明の効果】

以上説明したように本発明は、翻訳促進機能を有する一定の高次構造を構成する塩基配列、および該塩基配列を用いて異種タンパク質または異種ポリペプチドを開始コドンに束縛されることなく（AUG開始コドンを含むことなく）合成可能とする方法を提供した。本発明は、異種タンパク質またはポリペプチドの遺伝子組換え技術を利用した合成技術において大きな有用性を提供し、タンパク質の合成や構造解析などの基礎研究、ならびその応用としての医薬の開発・生産に至る広い分野に極めて多大に寄与するものである。

【0028】

【参考文献】

- 文献 1 : Sasaki J & Nakashima N. (1999) J Virol. 73, 1219-1226.
- 文献 2 : Sasaki J & Nakashima N (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 1512-1515.
- 文献 3 : RajBhandary (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 1325-1327.
- 文献 4 : Willson et al. (2000) Mol. Cell. Biol. 20, 4990-4999.
- 文献 5 : Wilson et al. (2000) Cell, 102, 511-520.
- 文献 6 : Domier et al. (2000) Virology, 268, 264-271.
- 文献 7 : McCarthy JEG (2000) Cur. Biol. R715-717.
- 文献 8 : van Regenmortel (2000) VIRUS TAXONOMY. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press , SanDiego pp 1162, p678-683.
- 文献 9 : Sasaki J. et al. (1998) Virology 244, 50-58.
- 文献10 : Nakashima N. et al (1999) Arch. Virol. 144, 2051-2058.
- 文献11 : Johnson KN & Christian PD (1998) J. Gen. Virol. 79, 191-203.
- 文献12 : Wilson JE. et al. (2000) Mol. Cell. Biol. 20, 4990-4999.
- 文献13 : Czibener C. et al. (2000) J. Gen. Virol. 81, 1149-1154.
- 文献14 : Leat N et al. (2000) J. Gen. Virol. 81, 2111-2119.
- 文献15 : Moon JS. et al. (1998) Virology 243, 54-65.

[0029]

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The director of National Institute of Sericultural and Entomologic
al Science

<120> Novel tertiary structure having ability to accelerate translation
activity

<130> NP01-1002

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 188

<212> RNA

<213> Plantia stali intestine virus

<400> 1

gacuauguga ucuauuuaa annagguuaa auuucgaggu uaaaaauagu uuuaauauug 60
cuauagucuu agaggucuuu uauauuuuaa cuuaccacac aagauggacc ggagcagccc 120
uccaauaucu aguguacccu cgugcucgcu caaacauuaa gugguguugu gcgaaaagaa 180

ucucacuu

188

<210> 2

<211> 187

<212> RNA

<213> Himetobi P virus

<400> 2

gaaaaugugu gaucugaaua gaaguaagaa aaauccuagu uauaauauuu uuaauacugc 60
uacauuuuuu agaccuuag uuauuuagcu uuaccgcca ggauggggug cagcguuccu 120
gcaauaucca gggcaccuag gugcagccuu guaguuuuag uggacuuuag gcuaaagaau 180
uucacua 187

<210> 3

<211> 189

<212> RNA

<213> Drosophila C virus

<400> 3

guuaagaugu gaucungcuu ccuauacaa uuugagagg uuaauaagaa ggaaguagug 60
cuauuuuau aaauagguu acuaauuagu uuacuguc aggaugccua uugcagccc 120
cauaauaucc aggacacccu cucugcuucu uauanganua gguugucuu uagaauaaga 180
aaauaaccu 189

<210> 4

<211> 188

<212> RNA

<213> Cricket paralysis virus

<400> 4

caaaaugug aucuugcuug uaaaauacaau uuugagaggu uaaaaauua caaguagugc 60
 uauuuuugua uuugagguag cuauuuagcu uuacguucca ggauGCCuag uggcagcccc 120
 acaauaucca ggaagcccuc ucugcgguuu uucagauuag guagucgaaa aaccuaagaa 180
 aunuaccu 188

<210> 5

<211> 186

<212> RNA

<213> Triatoma virus

<400> 5

uugacuangu gaucungcuu ucguauaaaa aucuguacau aaaagucgaa agauuugcua 60
 uaguuaaggu ugcgcungcc uauuuaggca uacuucucag ganggcgcgu ugcaguccaa 120
 caagauccag ggacuguaca gaauuuuccu auaccucgag ucggguuugg aaucuaaggu 180
 ugacuc 186

<210> 6

<211> 190

<212> RNA

<213> Black queen-cell virus

<400> 6

ccaacaangu gaucungcuu gcggaggcaa aaauugcaca guauaaaauc ugcaaguagu 60

gcuaungung gaancaccgu accuaauuag guuuacgcuc caagaucggu ggauagcagc 120
 ccuaucanaa ucuaggagaa cugugcuang uuuaagaagan uagguagucu cuaaacagaa 180
 caauuuaccu 190

<210> 7

<211> 175

<212> RNA

<213> Rhopalosiphum padi virus

<400> 7

aguguugugu gaucungcgc gauaaaugcu gacgugaaaa cguugcguau ngcuacaaca 60
 cuggguuagc uauuuagcuu uacuaaanaa gacgccgucg ugcagcccac aaaagucuaag 120
 auacgucaca ggagagcaua cgcuaaggucg cguugacnau ccuaauaana gaccu 175

【図面の簡単な説明】

【図1】 CrPV様ウイルス類のIGR-IRES領域の塩基配列の相同性を示す図である。

【図2】 図1の続きである。

【図3】 二次構造をコンピュータプログラム(MFOLD)が予測した図である。

【図4】 CrPV様ウイルス類のIGR-IRES領域の高次構造が保存されていることを示す図である。小文字の太字はステム構造形成塩基を、大文字の太字はシュードノットの塩基対形成に参与する塩基を意味する。

【図5】 各ステム構造部位の塩基対を示す図である。小文字の太字はステム構造形成塩基を、大文字の太字はシュードノットの塩基対形成に参与する塩基を意味する。

【図6】 変異導入実験に基づくPSIVのIGR-IRESの高次構造を示す図である。小文字の太字はステム構造形成塩基を、大文字の太字はシュードノットの塩基対形成に参与する塩基を意味する。図中の数字はPSIVゲノム配列上の塩基の位置、点(・)はステム構造形成塩基対形成部位、アスタリスク(*)はシュードノット構造の形成に参与する塩基対形成部位を意味する。

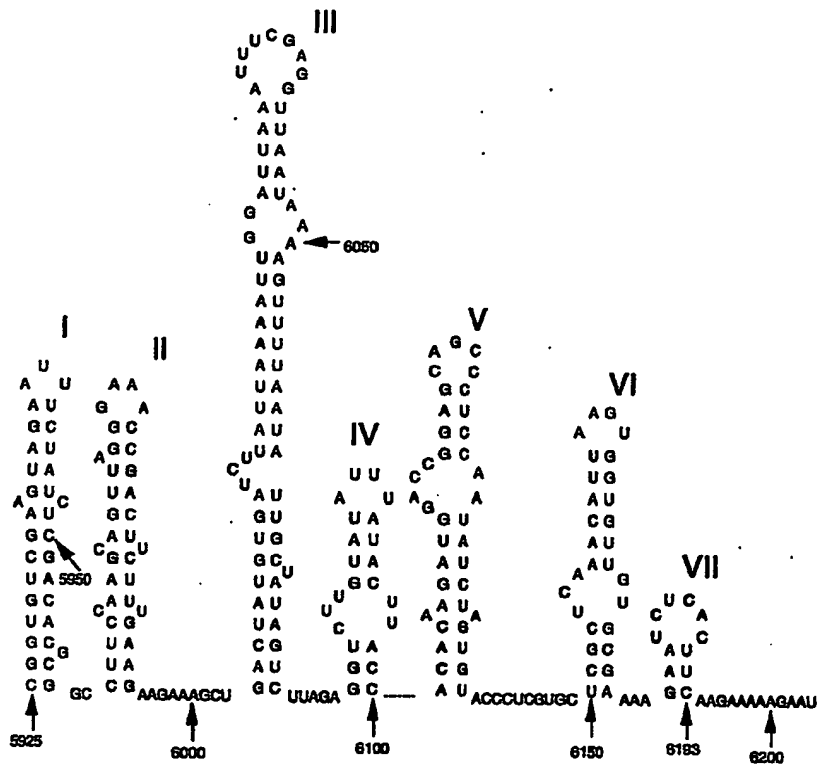
【図7】 上図は、プラスミドpT7CAT-5375の構造を示す。下図は、pT7CAT-5375のPSIV外被タンパク質コード領域の第1コドン(CAA:グルタミン)に変異を導入し、20種類の異なるアミノ酸から翻訳開始を行わせた結果を示すSDS電気泳動図である。

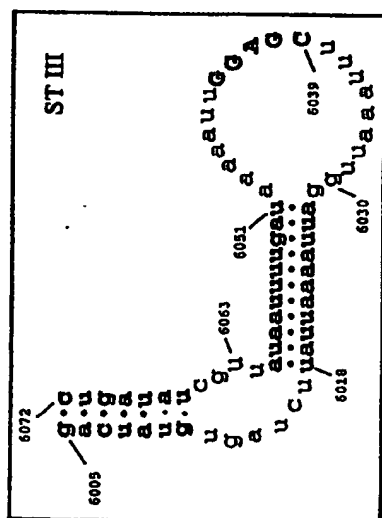
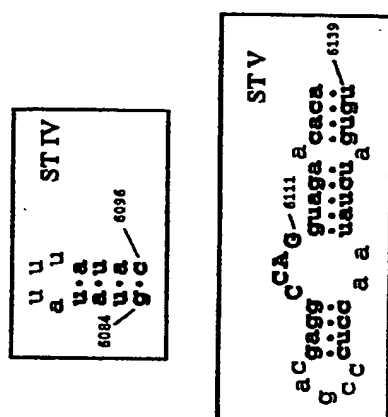
【図8】 翻訳開始点直前の高次構造の形成に参与する塩基対の組み合わせの変更と、それによるタンパク質の合成開始を示す図である。

図面

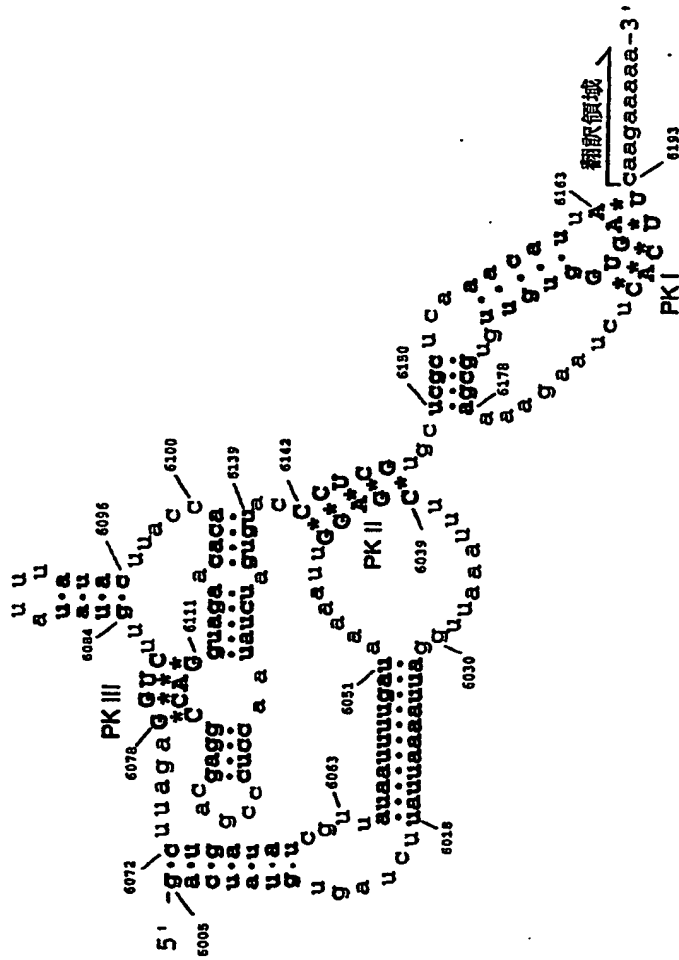
[illegible]

【図3】



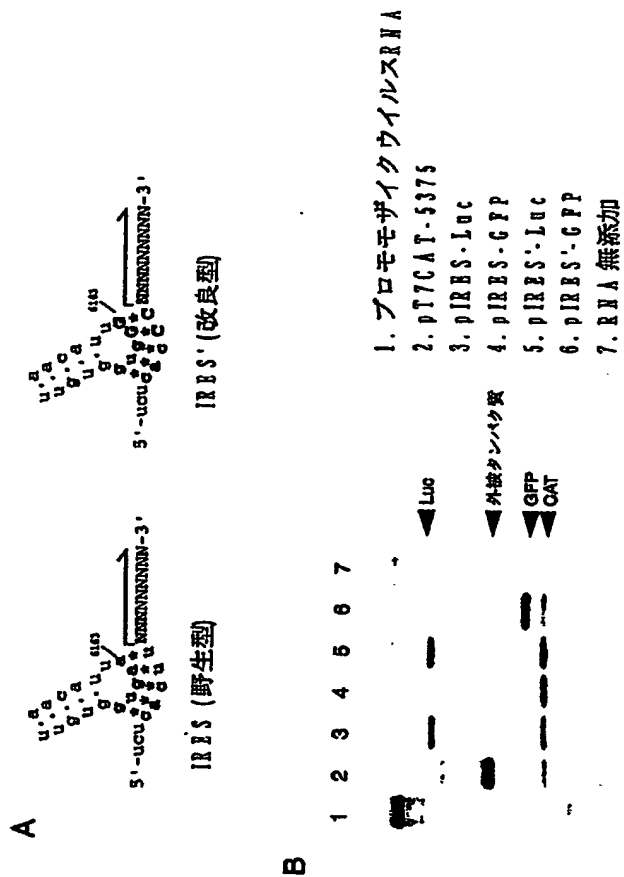


【図6】





【図8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

翻訳活性促進機能を保持する新規な塩基配列であって、アミノ末端に任意のアミノ酸を有するタンパク質又はポリペプチドの合成を可能にする塩基配列を提供すること。

【解決手段】

CrPV様ウイルス類で特定の高次構造が形成可能なこと、この高次構造の下流に遺伝子の読み枠を連結すると、様々なアミノ酸からタンパク質の翻訳開始が可能なこと、さらに、翻訳開始点直前の高次構造の形成に参与する塩基対の組み合わせを変更すると任意のコドンからの任意のタンパク質合成を開始できることを見出して本発明を完成した。

【選択図】 なし

特2001-016746

出願人履歴情報

識別番号 [391030284]

1. 変更年月日 1991年 3月19日
[変更理由] 新規登録
住 所 茨城県つくば市大わし1-2
氏 名 蚕糸・昆虫農業技術研究所長